

EBウィルスによる幼若B細胞株の樹立

著者	片峰 茂
号	870
発行年	1982
URL	http://hdl.handle.net/10097/19407

— 37 —

論文内容要旨

目 的

B細胞の分化の機序，分化過程における抗体（Ig）遺伝子の機構は，近年の分子生物学的手法の進歩により次第に明らかにされつつあるが，若し種々の分化段階のB細胞をクローン株として系統的に得る系を手にする事ができるならば，それはこの方面の研究に極めて有用であると考ええる。本論文における実験では，ヒトB細胞に特異的に感染し，トランスフォームさせる能力を有するEBウィルスを，高頻度に未分化B細胞を含有すると考えられる胎生16週の胎児肝細胞に感染させることにより，種々の分化段階のB細胞を，クローン株として樹立することを目的とした。

方 法 及 び 結 果

(1) 胎児肝よりのB細胞株樹立

胎生16週の胎児肝より比重遠心法により，浮遊系有核細胞を分離し，B 95-8株由来EBウィルスをm.o.i. 0.1で感染後，マイクロ培養プレートで培養を開始した。4日毎に培地交換をくり返した処，約6週後に24株が増殖良好なリンパ芽球様細胞株として樹立された。樹立株はいずれもEBNA陽性で，EBウィルスの感染成立を示した。またトランスフォーミング効率（24%）及び樹立までに要した期間より推測すると，各株はほぼ単クローンと考えられた。

(2) 樹立株のIg表現

24株のIg表現を，分泌Igは二抗体法RIAにより，膜表面及び細胞質Igは蛍光抗体法により調べた。その結果24株は次に示す5類型に分類することができた。培養上清中に大量のIgMを分泌し膜及び細胞質に μ 鎖・L鎖を有するもの（タイプ1）。培養上清中に微量のIgMを分泌し，1%以下の細胞の膜・細胞質に μ 鎖・L鎖を認めるもの（タイプ2）。培養上清中のIgMは殆ど検出されず，少数の細胞の膜と殆どの細胞の細胞質に μ 鎖のみを有し，L鎖は全く認められない，いわゆるプレB細胞様のもの（タイプ3）。培養上清中にIgMは検出されず，膜及び細胞質に μ 鎖は全く認められず，L鎖のみを有するもの（タイプ4）。培養上清中にIgMは検出されず，膜及び細胞質にも全く μ 鎖・L鎖を有さないもの（タイプ5）。なお，いずれの株にも κ ・ γ ・ α 鎖は認められなかった。 ^{14}C ロイシンによる細胞内ラベルサンプルのSDS-PAGEでも同様の結果が得られた。また，Igに関する形質は安定であり，樹立後1年の継代を経た現在でも不変である。各タイプの出現頻度は，タイプ1

2/24, タイプ 2 16/24, タイプ 3 1/24, タイプ 4 1/24, タイプ 5 2/24 であった。これは標的とした胎児肝中のB細胞系列の populationをある程度反映していると思われ、EBウィルスは、ある特定分化段階のB細胞に特異的に感染したのではなく、各分化段階のB細胞に無作為に感染したのではないかと推測できる。

(3) その他のマーカー

いずれの株も、B細胞マーカーとしてのC3レセプター、Fcレセプター、Ia様抗原（HLA-DR抗原）を有し、T細胞マーカーとしてのEロゼット形成能、T細胞分化抗原（Leu抗原）及び単球マーカーとしてのペルオキシダーゼ活性、貪食能は全く有さなかった。またTdT活性、cALL抗原も認められなかった。

考 察

胎生16週の胎児肝にEBウィルスを感染させることにより、Ig表現の異なる5種の細胞株を樹立した。EBウィルスが感染し、EBNAを発現すること、C3レセプター・Fc μ レセプター・Ia様抗原を膜に有するが、T細胞及び単球マーカーを全く有さないことより、現時点ではIg表現の全く認められない株も含めて、全てのクローンはB細胞系列のものとして矛盾は無く、当初の目的通り、種々の分化段階を反映するB細胞株を樹立したと考える。ただ全ての株にC3レセプター・Fcレセプター・Ia様抗原が一樣に認められる点は、従来のB細胞分化のschemeと異なっており、その意味づけは今後の解析を待たなければならない。G. Kleinらは、EBウィルスは分化の最終段階に近いB細胞（とりわけ膜IgM保有細胞）を標的とし、トランスフォームした細胞はIg分泌を行うとしたが、今回の実験は標的細胞集団を選択すれば、比較的容易に任意の分化段階のB細胞をEBウィルスによりトランスフォームし得ることを示しており、ウィルス学的に重要であるとともに、免疫学におけるEBウィルスの新たな有用性を提示したものと考える。

審 査 結 果 の 要 旨

β 細胞の分化の機序，特に分化過程に於ける抗体遺伝子の変異や進化（融合や重複）の機構は近年分子生物学的手法を用いて解明に近づいて来たが，個体発生学的手法を用いた解析に乏しい。著者は高頻度に未分化 β 細胞を含むと考えられる胎生16週のヒト胎児肝細胞を EB ウイルスでトランスフォームし，種々の分化段階の β 細胞をクローン株として樹立することにより， β 細胞分化の解明を企てた。

著者が手馴れた方法を用いるとトランスフォーミング効率は24%と高く，何れも EBNA 陽性で明らかに EB ウイルスに感染している単一クローン24株が得られたが，それらの性状は樹立後1年の継代を経た今日も不変である。

分泌 Ig の種類を RIA 法により，細胞膜表面と細胞質 Ig の種類を蛍光抗体法でしらべると5種類のタイプが得られ，タイプ1からタイプ5まで夫々2/24，16/24，1/24，1/24，2/24であった。先ずタイプ1は液中に大量の IgM が検出され，膜にも細胞質にも μ 鎖，L 鎖が証明される。一番多いタイプ2は液中の IgM は微量しか分泌しておらず，1%以下の細胞の膜細胞質に μ 鎖，L 鎖を認めるものである。タイプ3は少数の細胞膜と細胞質に μ 鎖のみが認められる。逆にタイプ4はL鎖のみが細胞膜と細胞質とに認められ，タイプ5は何れも検出されない。これらの結果は¹⁴Cロイシンで細胞をラベルして SDS-PAGE で解析した結果と一致した。更にいずれのクローン株も C3 レセプター，Fc レセプター，Ia 様抗原を有し， β 細胞マーカーを満足するが，T細胞マーカーも単球マーカーも有していなかった。

以上の成績は Klein がいった様に分化の最終段階の β 細胞のみを EB ウイルスがトランスフォームする訳ではなく，各分化段階の β 細胞に無作為に感染しトランスフォームし得ることを示唆する。とも角すべてが β 細胞系列と考えて良い。

以上免疫学的に EB ウイルスの有用性をひろげ， β 細胞分化の側面を明示した点，本論文は学位授与に値する。